

B21

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-224662

(43) 公開日 平成9年(1997)9月2日

(51) Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/04			C 1 2 N 9/04	Z
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 1/20			C 1 2 N 1/20	A
15/09	Z N A	9282-4B	15/00	Z N A A
// (C 1 2 N 9/04				

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-36346	(71) 出願人	000005968 三菱化学株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22) 出願日	平成8年(1996)2月23日	(72) 発明者	畠山 和久 茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号 三菱化学株式会社筑波研究所内
		(72) 発明者	桑原 孔一郎 茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号 三菱化学株式会社筑波研究所内
		(72) 発明者	小林 幹 茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号 三菱化学株式会社筑波研究所内
		(74) 代理人	弁理士 長谷川 晴司
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼおよびそれをコードするDNA

(57) 【要約】

【課題】 コリネ型細菌由来の6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼをコードするDNAを提供する。

【解決手段】 公知の配列を基に設計したプライマーDNAを用いて、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233のDNAから上記酵素をコードするDNAの部分断片を単離し、ブランクハイブリダイゼーション、PCR反応等の手法を用いて、該酵素をコードするDNAを得る。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列で示される6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ。

【請求項2】 請求項1記載の6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼをコードするDNA。

【請求項3】 配列表の配列番号1記載の塩基配列中374番目から1849番目の塩基配列で示される6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼをコードするDNA。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼおよびそれをコードするDNAに関する。

【0002】

【従来の技術】6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼは、ペントースリン酸回路の酵素であり、6-ホスホグルコン酸を酸化および脱炭酸してD-リブローズ-5-リン酸を生成する不可逆反応の触媒である。6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子については、原核生物ではエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 由来の遺伝子 [Gene, Vol. 27, p. 253 (1984)]、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) 由来の遺伝子 [J. Biol. Chem., Vol. 261, p. 13744 (1986)]、シネココッカス (*Synechococcus* sp. Strain PCC7942) 由来の遺伝子 [J. Bacteriol., Vol. 172, p. 4023 (1990)] 等が、単離され、その塩基配列が決定されている。

【0003】しかしながら、アミノ酸合成等、産業上重要なコリネ型細菌については、酵素タンパク及びその塩基配列について報告されていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】一般に由来が異なると、酵素遺伝子は宿主において発現しないまたは発現しにくいことから、コリネ型細菌内で発現可能なコリネ型細菌由来の6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼをコードするDNA断片の単離が望まれていた。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、遺伝子組み換えの手法を駆使することにより、コリネ型細菌から6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼおよびそれをコードするDNAが単離可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明の要旨は、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列で示される6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼおよびそれをコードするDNAに存する。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明の6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼおよびそれをコードするDNA (以下、gnd遺伝子と略記する) は、コリネ型細菌の染色体DNA、具体的には、プレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) 株等の染色体DNAから以下に述べる方法で単離、決定することができる。

【0007】まず、上記コリネ型細菌を常法 [例えば、特開昭51-130592号公報参照] に従い培養し、培養物から菌体を集め、該菌体から染色体DNAを抽出する。染色体DNAは、例えば、特開平5-15378号公報の実施例1(A)に記載の方法等により菌体から容易に抽出することができる。エシエリヒア・コリ等の6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼの一次構造の相同性の高い部分から逆翻訳したオリゴデオキシリボヌクレオチドをプライマーとしてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行い、gnd遺伝子の部分断片を得ることができる。

【0008】該断片を鋳型として、染色体DNA制限酵素分解物に対してサザンハイブリダイゼーションを行い、少なくともgnd断片の一部を含む、染色体DNA制限酵素断片の大きさを決定する。PCRで得られたgnd遺伝子の部分断片を鋳型として、遺伝子ライブラリー入FIX IIからブランクハイブリダイゼーションで該断片を含む入ファージを単離し、これをクローニングする。

【0009】この染色体DNA断片を適当な制限酵素を用いて切り出し、得られたDNA断片を適当なクローニングベクター、例えばpUC118 (宝酒造製) ヘサブクローニングし、エシエリヒア・コリJM109株 (宝酒造製) を形質転換する。この形質転換株を適当な抗生物質選択下で培養し、培養物から菌体を回収し、菌体から常法、例えばアルカリ-SDS法によりプラスミドを抽出する。このプラスミドに挿入されたDNAの塩基配列を決定することにより、本発明のgnd遺伝子を含むDNA断片を取得することができる。

【0010】このDNA断片の塩基配列は、ジデオキシヌクレオチド終止法 [dideoxy chain termination法; Sanger, F., et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 74, p. 5463, (1977)] により決定することができる。このようにして決定した大きさ約2kbのDNA断片の塩基配列を後記配列表の配列番号1に示す。

【0011】この配列中に存在するオープンリーディングフレームから、本発明の6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼは配列番号1記載のアミノ酸配列からなり、またそれをコードする遺伝子は、例えば、配列番号1記載の塩基配列中の374番目から1849番目までの塩基配列で示されるものである。本発明におけるgnd遺

伝子は、天然の細菌、例えばコリネ型細菌の染色体DNAから分離されたもののみならず、本明細書記載の塩基配列を元に、通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製システム-1プラス(System-1 Plus)を用いて合成されたものであってもよい。

【0012】また、前記の如くコリネ型細菌の染色体から取得される本発明のDNA断片は、6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていても、削除されていてもよく、新たに塩基が挿入されていてもよく、あるいは塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、さらにそれらの塩基配列にハイブリダイズする塩基配列であってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明の6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0013】

【実施例】以下、実施例によりさらに具体的に説明する。しかしながら、これらの実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

(A) プレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

プレバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)を、半合成培地であるA培地〔組成：尿素 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  6mg、酵母エキス 2.5g、カザミノ酸 5g、ビオチン 200 $\mu\text{g}$ 、塩酸チアミン 200 $\mu\text{g}$ 、グルコース 20gを蒸留水に溶解して1リットルとする〕1リットル中で対数増殖期後期まで培養した後に菌体を回収した。

【0014】得られた菌体をリゾチームを10mg/mlの濃度で含有する溶液〔組成：10mM NaCl、20mM トリス緩衝液(pH8.0)、1mM EDTA $\cdot$ 2Na〕15mlに懸濁した。該懸濁液にプロテナーゼKを100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度で添加し、これを37℃で1時間インキュベートした。次に、ドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間インキュベートして溶菌させた。得られた溶菌液に等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加して室温で10分間穏やかに振盪した後、その全量を10~12℃で20分間、5,000 $\times$ gの遠心分離に供し、その上清画分を分取した。該上清画分中に酢酸ナトリウムをその濃度が0.3Mとなるように添加し、次いで2倍量のエタノールを穏やかに添加した。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒で撪め取り、これを70%エタノールで洗浄して風乾した。得られたDNAは、溶液〔組成：10mM トリス緩衝液(pH7.5)、1mM EDTA $\cdot$ 2Na〕5mlを

加えて4℃で一晩静置した後、実験に供した。

【0015】(B) gnd遺伝子の部分断片の採取  
エシエリヒア・コリ(*Escherichia coli*) [J. Bacteriol., Vol. 173, p. 968 (1991)]、エルウィニア・クリサンセミ(*Erwinia chrysanthemi*) [Gene, Vol. 101, p. 51 (1991)]、および、ロイコノストック・メセンテロイデス(*Leuconostoc mesenteroides*) [J. Biol. Chem., Vol. 266, p. 13028 (1991)]の6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼをコードするDNA遺伝子の塩基配列をもとに推定したアミノ酸配列の相同性部分の配列をもとに遺伝子クローニング用のPCRプライマーDNAを設計した。

【0016】ポリメラーゼ連鎖反応の一例を以下に示す。反応液は以下の組成である。濃度は最終濃度を表す。〔25ユニット/ml Taq DNAポリメラーゼ、10mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)、50mM KCl、1.5mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.25mM dATP、0.25mM dCTP、0.25mM dGTP、0.25mM dTTP、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  染色体DNA飽和水溶液、1 $\mu\text{M}$  プライマー1：ATGGTICA(TC)AA(TC)GGNAT(ATC)GA(AG)TA(TC)GGNGA(TC)ATG (配列番号1記載のアミノ酸配列196~206を元にして設計した配列：配列番号2)、1 $\mu\text{M}$  プライマー2：GCICCA(AG)AA(AG)TA(AG)TCIC(TG)(TC)TGIGC(TC)TG (配列番号1記載のアミノ酸配列459~467を元にして設計した配列：配列番号3)、として100 $\mu\text{l}$ の反応混合液を用いる。〕

ポリメラーゼ連鎖反応の反応条件は例えば、94℃で1分、55℃で2分、72℃で3分を1サイクルとする25サイクルである。そして上記反応で得られたDNAを精製した。

【0017】それぞれ最終濃度が、50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.9)、10mM  $\text{MgCl}_2$ 、20mM ジチオスレイトール、1mM ATP、1 $\mu\text{M}$   $\text{it}/10\mu\text{l}$  T4DNAリガーゼ、50ng/10 $\mu\text{l}$  pGEM-Tベクター、10ng/10 $\mu\text{l}$  PCR産物となるように各成分を添加し、16℃で3時間反応させて、PCR産物DNAを結合させた。

【0018】ついで、常法[J. Mol. Biol., 53, 159 (1970) 参照]に従って、得られた溶液を用いてエシエリヒア・コリJM109を形質転換した。得られた形質転換菌を選択培地〔組成：トリプトン 10g、酵母エキス 5g、NaCl 5g、寒天 15g、アンピシリン 50mg、イソプロピオチオガラクトシド 0.238g、X-gal 0.2g、ジメチルホルムアミド2mlを蒸留水に溶解して1リットルとする〕に塗抹し、37℃で16時間培

養した。

【0019】こうして得られたコロニーを青/白カラースクリーニングした。選択培地上に生育した菌株を、アンピシリンを最終濃度で50 $\mu$ g/ml含有するL培養液〔トリプトン 10g、酵母エキス 5g、NaCl 5gを蒸留水に溶解して1リットルとする〕に接種し、これを37℃で7時間培養した。培養液を4℃で10分間8,000 $\times$ gの遠心分離にかけて菌体を回収した。回収した菌体からアルカリ-SDS法〔T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular cloning, p. 90-91 (1982) 参照〕によりプラスミドを抽出した。

【0020】次に、得られた該プラスミドに挿入された染色体DNA断片の塩基配列をジデオキシヌクレオチド酵素法により決定した。具体的には、上記培養物より抽出したプラスミドDNAをパーキン・エルマー社製カタリスト800モレキュラー・バイオロジー・ラボステーション (CATALYST 800 Molecular Biology Labstation; Perkin-Elmer) を用いてプロトコールに従い反応させた後、パーキン・エルマー社製373A DNAシーケンサーによりプラスミドの挿入DNA断片の塩基配列を決定した。

【0021】決定した塩基配列を翻訳して得られるタンパク質と、既知のエシエリヒア・コリの6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼとの相同性の比較により、それがプレビバクテリウム・フラバムMJ-233のgnd遺伝子の一部 (配列番号1記載の塩基配列中959番目から1773番目) であることが判明した。

(C) gnd遺伝子の部分断片を含む染色体DNA制限酵素断片の大きさ決定

染色体DNAを制限酵素BamHI、EcoRI、HindIII、SalIでそれぞれ分解した。これらをOncor社製Probe tech 2を用いてサザンハイブリダイゼーション用のナイロンメンブレンフィルターを作成した。

【0022】上記、PCRで得られたgnd遺伝子の部分断片を鋳型に、標識にはアマシャム社製 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP AA0005を用いて、宝酒造社製RamdomPrimer DNA Labelling Kit Ver. 2の方法でプローブを標識した。フィルターを以下の組成の溶液〔5 $\times$ SSC溶液、5 $\times$ デンハルト溶液、0.5% ドデシル硫酸ナトリウム、0.1mg/ml SIGMA社製SALMON TESTES DNA For Hybridization (10mg/ml)〕で65℃で2時間プレハイブリダイゼーションを行った。なお2 $\times$ SSC溶液は、以下の組成〔3M NaCl、0.3M クエン酸ナトリウム〕、100 $\times$ デンハルト溶液は以下の組成〔2% 牛血清ア

ルブミン、2% ポリビニルピロリドン、2% フィコール〕である。

【0023】上記で調製したプローブを加え、65℃で一晩サザンハイブリダイゼーションを行った。フィルターを2 $\times$ SSC、0.1% SDSにて65℃で15分間緩やかに振盪させながら洗浄した。次にフィルターを1 $\times$ SSC、0.1% SDSにて65℃で15分間緩やかに振盪させながら洗浄した。フィルターを風乾した後、オートラジオグラフィーを行った。読みとりは、富士写真フィルム社製バイオイメージングアナライザーBAS-2000を用いた。

【0024】この結果、gnd遺伝子の部分断片を含む染色体DNA制限酵素断片の大きさは、BamHI断片、EcoRI断片、HindIII断片、SalI断片が、それぞれ約5kb、8kb、5kb、9kbであった。

(D) gnd遺伝子の部分断片を含む染色体DNA BamHI断片の単離

0.2% マルトース、10mM MgSO<sub>4</sub>を添加したLB培養液に、エシエリヒア・コリP2329を接種し、37℃で培養した。そして遺伝子ライブラリー $\lambda$ FIXIIファージ溶液400 $\mu$ lにP2329培養液を混合し、37℃で15分間培養した。次に4mlのストップアガー (50℃保温) を加え、入プレートに均一になるように撒いて、37℃で一晩培養した。

【0025】ニトロセルロースフィルターを入プレート上に空気が入らないように静かに置いて、予めフィルターに書いた目印の点をプレートに写した。フィルターを剥がし、吸着面を上にして、以下の溶液に浸した濾紙上に置き、順次5分間処理した (溶液1: [0.5M NaOH、1.5M NaCl]、溶液2: [1M トリス-塩酸 (pH7.5)、0.75M NaCl]、溶液3: 2 $\times$ SSC)。フィルターを乾燥させた後、80℃で30分間加熱してフィルターへDNAを固定化した。

【0026】フィルターを以下の混合溶液〔5 $\times$ SSPE、1 $\times$ デンハルト溶液、50%ホルムアミド、0.1mg/ml SIGMA社製SALMON TESTES DNA For Hybridization (10mg/ml)〕にて42℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った。2 $\times$ SSPEの組成は、3.6M NaCl、0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.02M EDTAである。上記(C)項で調製したDNAプローブを加え、42℃で一晩、ハイブリダイゼーションを行った。

【0027】フィルターを5 $\times$ SSPE、1 $\times$ デンハルト溶液、50%ホルムアミド溶液にて42℃で15分間緩やかに振盪させながら洗浄した。次にフィルターを2 $\times$ SSPE、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム溶液にて42℃で15分間緩やかに振盪させながら洗浄し

た。フィルターを風乾した後、オートラジオグラフィーを行った。読みとりは、富士写真フィルム社製バイオイメージングアナライザーBAS-2000を用いた。

【0028】目的プラークのソフトアガロースを砕いて、200 $\mu$ lのSM緩衝液に懸濁した。上記溶液10 $\mu$ lを、37℃で3～4時間培養したエシエリヒア・コリP2329株300 $\mu$ lと混合し、トップアガロースを加えて入プレートに撒いた。37℃で一晩培養し、プラークを形成させた。この入プレートに4mlのSM緩衝液を加え、トップアガロースを掻き取って、4℃で1時間穏やかに振盪した。トップアガロースを混入させないように、上澄みを新しいチューブに移し、クロロホルムを数滴加えた。そして5,000rpmで5分間遠心し、上澄みを得た。さらにDNaseおよびRNase（最終濃度1 $\mu$ g/ml）を加え、37℃で15分間保温した。等量の20% ポリエチレングリコール（平均分子量6,000）-2M NaClを加え、氷上で1時間放置した後、4℃、10,000rpmで10分間遠心後、上澄みを完全に除去した。250 $\mu$ lのトリス-EDTA緩衝液を加えて懸濁し、5 $\mu$ lの10% ドデシル硫酸ナトリウムを加え、68℃で5分間加熱後、10 $\mu$ lの5M NaClを加え、等量のフェノール/クロロホルムを加え、よく懸濁した。12,000rpmで10分間遠心し、水層を新しいチューブに移した。イソプロパノール沈殿後、70% エタノール洗浄・乾燥させ、50 $\mu$ lのトリス-塩酸緩衝液に懸濁した。

【0029】以上の操作で得られた入FIXIIのDNAをBamHIで切断した。切断物をアガロース電気泳動して、gnd遺伝子の一部を含む染色体DNAのBamHI断片を分離・精製した。このBamHI断片をpUC118でサブクローニングした。サブクローニングしたBamHI断片を含むpUC118をBamHIで切断し、BamHI断片を回収した。

【0030】(E) gnd遺伝子の全塩基配列決定  
(D)で得られた大きさ約5kbのDNA断片溶液を制限酵素Sau3AIを用いて37℃で処理してDNA断片を部分分解した。また、クローニングベクターpUC118を制限酵素BamHIで切断した。得られたベクターDNA断片と部分分解DNA断片とを混合し、この混合液にそれぞれ最終濃度が50mM トリス緩衝液(pH7.6)、10mM ジチオスレイトール、1m

M ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>、および1unit/10 $\mu$ l T4DNAリガーゼとなるように各成分を添加し、ベクターDNA断片と部分分解DNA断片とを結合させた。

【0031】上記と同様に大きさ約5kbのDNA断片溶液を制限酵素TaqIと反応させて部分分解DNA断片を調製した。クローニングベクターpUC118を制限酵素AccIで切断した後、これを上記と同様にして部分分解DNAと結合させた。得られたプラスミド混合液を用い、常法によりエシエリヒア・コリJM109株を形質転換し、前記の選択培地に塗抹した。

【0032】上記選択培地に生育した菌株を常法に従い液体培養し、得られた培養物よりプラスミドDNAを抽出した。抽出したプラスミドDNAを用いて、ベクターpUC118に挿入された部分分解DNA断片の塩基配列を決定した。そして、これらの個々の配列の連結は、パーキン・エルマー社製のシーケンズ解析ソフトウェアアッセンブラー(Autoassembler)を用いて行った。

【0033】この結果、配列番号1記載の塩基配列が判明した。それを翻訳したタンパク質のアミノ酸一次構造と既知のエシエリヒア・コリの6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼのアミノ酸一次構造との相同性の比較により、それがプレバクテリウム・フラバムMJ-233のgnd遺伝子オープンリーディングフレーム配列番号1記載の塩基配列中374番目から1852番目)を含んでいることが判明した。

【0034】

【発明の効果】本発明により提供される6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を用いてコリネ型細菌を育種改良することにより、6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ高産能を有するコリネ型細菌の取得が可能となる。

【0035】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1916

鎖の数：二本鎖

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列

AATGATCCAG TGGATTCGGC AATGGCGGCG TAGACACCAC CGTTGACCAA GCCCACCAC	60
TGCAGGTGCT TGGATGCCAC GTGAAGTTTC CTGACCACGT GACCGGGTTC GATGGTGGTG	120
TAGCGCAGTC CAAGATTGCG GTGAGGCCG TAATTGGCGT TGTGAGTGC TTCAAGTTGC	180
TCAGTTGTTA AAGCTCTGGT GCGGCAAGT TCTGCAAGCG AAAGCAGATC TTGGGGTTGA	240
TCATCGCGGG AAGTCATATT TTATTACTCT AGTCGGCCTA AAATGGTTGG ATTTTCACCT	300
GCTGTGACCT GGTAAATGG CCACTACCCC CAAATGGTCA CACCTTTAG GCGATTITG	360
CTGACACCGG GCT	373
ATG CCG TCA AGT ACG ATC AAT AAC ATG ACT AAT GGA GAT AAT CTC GCA	421

Met	Pro	Ser	Ser	Thr	Ile	Asn	Asn	Met	Thr	Asn	Gly	Asp	Asn	Leu	Ala	
1				5					10					15		
CAG	ATC	GGC	GTT	GTA	GGC	CTA	GCA	GTA	ATG	GGC	TCA	AAC	CTC	GCC	CGC	469
Gln	Ile	Gly	Val	Val	Gly	Leu	Ala	Val	Met	Gly	Ser	Asn	Leu	Ala	Arg	
			20					25					30			
AAC	TTC	GCC	CGC	AAC	GGC	CAC	ACT	GTC	GCT	GTC	TAC	AAC	CGC	AGC	ACT	517
Asn	Phe	Ala	Arg	Asn	Gly	His	Thr	Val	Ala	Val	Tyr	Asn	Arg	Ser	Thr	
			35					40					45			
GAC	AAA	ACC	GAC	AAG	CTC	ATC	GCC	GAT	CAC	GGC	TCC	GAA	GGC	AAC	TTC	565
Asp	Lys	Thr	Asp	Lys	Leu	Ile	Ala	Asp	His	Gly	Ser	Glu	Gly	Asn	Phe	
			50					55					60			
ATC	CCT	TCC	GCA	ACC	GTC	GAA	GAG	TTC	GTA	GCA	TCC	CTG	GAA	AAG	CCA	613
Ile	Pro	Ser	Ala	Thr	Val	Glu	Glu	Phe	Val	Ala	Ser	Leu	Glu	Lys	Pro	
65						70					75				80	
CGC	CGC	GCC	ATC	ATC	ATG	GTT	CAG	GCT	GGT	AAC	GCC	ACC	GAC	GCA	GTC	661
Arg	Arg	Ala	Ile	Ile	Met	Val	Gln	Ala	Gly	Asn	Ala	Thr	Asp	Ala	Val	
						85					90				95	
ATC	AAC	CAG	CTG	GCA	GAC	GCC	ATG	GAC	GAA	GGC	GAC	ATC	ATC	ATC	GAC	709
Ile	Asn	Gln	Leu	Ala	Asp	Ala	Met	Asp	Glu	Gly	Asp	Ile	Ile	Ile	Asp	
			100						105				110			
GGC	GGC	AAC	GCC	CTC	TAC	ACC	GAC	ACC	ATT	CGT	CGC	GAG	AAG	GAA	ATC	757
Gly	Gly	Asn	Ala	Leu	Tyr	Thr	Asp	Thr	Ile	Arg	Arg	Glu	Lys	Glu	Ile	
			115					120					125			
TCC	GCA	CGC	GGT	CTC	CAC	TTC	GTC	GGT	GCT	GGT	ATC	TCT	GGC	GGC	GAA	805
Ser	Ala	Arg	Gly	Leu	His	Phe	Val	Gly	Ala	Gly	Ile	Ser	Gly	Gly	Glu	
			130					135					140			
GAA	GGC	GCA	CTC	AAC	GGC	CCA	TCC	ATC	ATG	CCT	GGT	GGC	CCA	GCA	AAG	853
Glu	Gly	Ala	Leu	Asn	Gly	Pro	Ser	Ile	Met	Pro	Gly	Gly	Pro	Ala	Lys	
145						150					155			160		
TCC	TAC	GAG	TCC	CTC	GGA	CCA	CTG	CTT	GAG	TCC	ATC	GCT	GCC	AAC	GTT	901
Ser	Tyr	Glu	Ser	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Glu	Ser	Ile	Ala	Ala	Asn	Val	
						165					170			175		
GAC	GGC	ACC	CCA	TGT	GTC	ACC	CAC	ATC	GGC	CCA	GAC	GGC	GCC	GGC	CAC	949
Asp	Gly	Thr	Pro	Cys	Val	Thr	His	Ile	Gly	Pro	Asp	Gly	Ala	Gly	His	
			180						185				190			
TTC	GTC	AAG	ATG	GTC	CAC	AAC	GGC	ATC	GAG	TAC	GCC	GAC	ATG	CAG	GTC	997
Phe	Val	Lys	Met	Val	His	Asn	Gly	Ile	Glu	Tyr	Ala	Asp	Met	Gln	Val	
			195					200					205			
ATC	GGC	GAG	GCA	TAC	CAC	CTT	CTC	CCG	TAC	GCA	GCA	GGC	ATG	CAG	CCA	1045
Ile	Gly	Glu	Ala	Tyr	His	Leu	Leu	Pro	Tyr	Ala	Ala	Gly	Met	Gln	Pro	
			210					215					220			
GCT	GAA	ATC	GCT	GAG	GTT	TTC	AAG	GAA	TGG	AAC	GCA	GGC	GAC	CTG	GAT	1093
Ala	Glu	Ile	Ala	Glu	Val	Phe	Lys	Glu	Trp	Asn	Ala	Gly	Asp	Leu	Asp	
225						230					235			240		
TCC	TAC	CTC	ATC	GAG	ATC	ACC	GCA	GAG	GTT	CTC	TCC	CAG	GTG	GAT	GCT	1141
Ser	Tyr	Leu	Ile	Glu	Ile	Thr	Ala	Glu	Val	Leu	Ser	Gln	Val	Asp	Ala	
						245					250			255		
GAA	ACC	GGC	AAG	CCA	CTG	ATC	GAC	GTC	ATC	GTT	GAC	GCT	GCA	GGC	CAG	1189
Glu	Thr	Gly	Lys	Pro	Leu	Ile	Asp	Val	Ile	Val	Asp	Ala	Ala	Gly	Gln	
						260					265			270		

AAG GGC ACC GGA CGT TGG ACC GTC AAG GCT GCT CTT GAT CTG GGT ATT	1237
Lys Gly Thr Gly Arg Trp Thr Val Lys Ala Ala Leu Asp Leu Gly Ile	
275 280 285	
GCT ACC ACC GGC ATC GGC GAA GCT GTT TTC GCA CGT GCA CTC TCC GGC	1285
Ala Thr Thr Gly Ile Gly Glu Ala Val Phe Ala Arg Ala Leu Ser Gly	
290 295 300	
GCA ACC AGC CAG CGC GCT GCA GCA CAG GGC AAC CTA CCT GCA GGT GTC	1333
Ala Thr Ser Gln Arg Ala Ala Ala Gln Gly Asn Leu Pro Ala Gly Val	
305 310 315 320	
CTC ACC GAT CTG GAA GCA CTT GGC GTG GAC AAG GCA CAG TTC GTC GAA	1381
Leu Thr Asp Leu Glu Ala Leu Gly Val Asp Lys Ala Gln Phe Val Glu	
325 330 335	
GAC GTT CGC CGT GCA CTG TAC GCA TCC AAG CTT GTT GCT TAC GCA CAG	1429
Asp Val Arg Arg Ala Leu Tyr Ala Ser Lys Leu Val Ala Tyr Ala Gln	
340 345 350	
GGC TTC GAC GAG ATC AAG GCT GGC TCC GAC GAG AAC AAC TGG GAT GTT	1477
Gly Phe Asp Glu Ile Lys Ala Gly Ser Asp Glu Asn Asn Trp Asp Val	
355 360 365	
GAC CCT CGC GAC CTC GCT ACC ATC TGG CGC GGC GGC TGC ATT ATT CGC	1525
Asp Pro Arg Asp Leu Ala Thr Ile Trp Arg Gly Gly Cys Ile Ile Arg	
370 375 380	
GCT AAG TTC CTC AAC CGC ATC GTC GAA GCA TAC GAT GCA AAC GCT GAA	1573
Ala Lys Phe Leu Asn Arg Ile Val Glu Ala Tyr Asp Ala Asn Ala Glu	
385 390 395 400	
CTT GAG TCC CTG CTG CTC GAC CCT TAC TTC AAG AGC GAG CTC GGC GAC	1621
Leu Glu Ser Leu Leu Leu Asp Pro Tyr Phe Lys Ser Glu Leu Gly Asp	
405 410 415	
CTC ATC GAT TCA TGG CGT CGC GTG ATT GTC ACC GCC ACC CAG CTT GGC	1669
Leu Ile Asp Ser Trp Arg Arg Val Ile Val Thr Ala Thr Gln Leu Gly	
420 425 430	
CTG CCA ATC CCA GTG TTC GCT TCC TCC CTG TCC TAC TAC GAC AGC CTG	1717
Leu Pro Ile Pro Val Phe Ala Ser Ser Leu Ser Tyr Tyr Asp Ser Leu	
435 440 445	
CGT GCA GAG CGT CTG CCA GCA GCC CTG ATC CAG GGA CAG CGC GAC TTC	1765
Arg Ala Glu Arg Leu Pro Ala Ala Leu Ile Gln Gly Gln Arg Asp Phe	
450 455 460	
TTC GGT GCG GAC ACC TAC AAG GGC ATC GAC AAG GAT GGC CCC TTC CAC	1813
Phe Gly Ala Asp Thr Tyr Lys Gly Ile Asp Lys Asp Gly Pro Phe His	
465 470 475 480	
ACC GAG TGG TCC GGC GAC CGC TCC GAG GTG GAA GCT	1849
Thr Glu Trp Ser Gly Asp Arg Ser Glu Val Glu Ala	
485 490	
TAAAGGCTCC CCCTAAATAG CAAAACGCTA AAACCCCTCA CAGTCACCTT AGGTTGTAAG	1909
GGGTTT	1916

配列番号：2

配列の長さ：

鎖の数：1本鎖

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

ATGGTNCAYA AYGGNATHGA RTAYGGNGAY ATG

配列番号：3

配列の長さ：

鎖の数：1本鎖

配列の型：核酸

33

トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列  
GCNCCRAART ARTCNCKYTG NGCYTG

26

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 1/20

C 1 2 R 1:13)

(72)発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号

三菱化学株式会社筑波研究所内